Aus dem Physiologischen Institut der Universität München
Chemische Abteilung (Prof. Hahn)
Direktor: Professor Dr. Ph. Broemser

Über die Wirkung von Sauerstoff auf den Stoffwechsel von normalen Zellen und Tumorgewebe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ilse Fischbach
aus Herleshausen

München 1938
Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München
Chemische Abteilung (Prof. Hahn)
Direktor: Professor Dr. Ph. Broemser

Über die Wirkung von Sauerstoff auf den Stoffwechsel von normalen Zellen und Tumorgewebe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ilse Fischbach
aus Herleshausen

München 1938
Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Referent:
Prof. Dr. *Hahn*

Tag der mündlichen Prüfung:
28. VI. 1938

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die Zellen aller tierischen Lebewesen haben eine starke Sauerstoffzehrung durch Oxydationsvorgänge beim intermediären Stoffwechsel. *Lavoisier* bezeichnete daher den tierischen Stoffwechsel als Verbrennung, doch besteht diese Analogie nur in Bezug auf die Gesamtbilanz, die Aufnahme von Sauerstoff und Abgabe von Kohlendioxyd. Der Unterschied der beiden Vorgänge liegt darin, daß im tierischen Körper Stoffe bei einer Temperatur oxydiert werden, die außerhalb des Körpers sehr viel höher sein muß, damit die gleichen Stoffe angegriffen werden. Die biologischen Oxydationen werden ermöglicht durch das Fermentsystem des Körpers.

Die Bedeutung der Oxydationen als energieliefernde Reaktionen wachsender Zellen erkennt man aus der Beobachtung, daß Kern- und Zellteilung aufhören, wenn man Eiern den Sauerstoff entzieht: *Loeb,* Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies (zit. nach *Warburg,* Der Stoffwechsel der Tumoren). Die Versuche von *Warburg* über die Entwicklungsphysiologie des Seeigeleies zeigen, daß die Atmungsgröße $\left(\text{Quotient} = \frac{\text{cmm verbrauchter Sauerstoff}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunde}}\right)$ nach der Befruchtung in den ersten 10 Minuten auf das Sechsfache ansteigt und im Verlaufe der Entwicklung weiter steigt.

Warburg stellt daher fest, „daß mit Zunahme der sichtbaren Struktur eine Zunahme der Oxydationsgeschwindigkeit verbunden ist".

Die Wirkung von Sauerstoff auf den Zellstoffwechsel ist in der vorliegenden Arbeit beschrieben in Bezug auf den Kohlehydratstoffwechsel. Im Muskel und bei wachsenden Zellen, über deren Beeinflussung durch Sauerstoff die meisten Veröffentlichungen vorhanden sind, spielt der Kohlehydratstoffwechsel als energieliefernde Reaktion eine weitaus größere Rolle, als Proteolyse und Lypolyse. Die Gleichung des oxydativen Kohlehydratstoffwechsels ist: $C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 = 6\,CO_2 + 6\,H_2O$. Der vollständige Abbau bis zu Kohlendioxyd und Wasser findet nur bei Gegenwart von Sauerstoff statt. Bei Abwesenheit von Sauerstoff entsteht aus dem Kohlehydrat der Zelle Milch-

säure; dieser als Glykolyse bezeichnete Vorgang kann durch die Gleichung $C_6H_{12}O_6 = 2\,C_3H_6O_3$ ausgedrückt werden.

Es war schon Claude *Bernard* bekannt, daß die frisch herausgenommene, gewaschene Leber die Fähigkeit besitzt, das in ihr enthaltene Glykogen in Zucker zu überführen. (C. r. Acad. scienc. Paris **41**, 461 (1855); **44**, 578 (1857). An der überlebenden Leber zeigte *Embden* in Durchströmungsversuchen den Zuckerabbau zu Milchsäure (Zbl. f. Physiol. **18**, 832 (1905); Bioch. Z. **45**, 1 (1912); siehe auch *Embden*, Chemismus der Muskelkontraktion im Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. VIII, 1, S. 369). Eine Säure, die er für Milchsäure hielt, hatte schon 1807 *Berzelius* in den Muskelextrakten gehetzten Wildes gefunden und 40 Jahre später wurde von *Liebig* aus Muskelsaft frisch getöteter Tiere kristallisiertes Zinklaktat dargestellt und eine Elementaranalyse gegeben. Am herausgeschnittenen Muskel haben als erste *Fletcher* und *Hopkins* (Journ. of Phys. **35**, 247, 1906/07) Milchsäurebildung bei Reizung des Kaltblütermuskels nachgewiesen. Bei vielen anderen Organen ist die Glykolyse von anderen Autoren beobachtet worden, womit sich der Satz von *Hoppe-Seyler* bestätigt, daß „die Bildung von Milchsäure bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff und bei Gegenwart von Glykogen oder Glukose höchstwahrscheinlich eine Eigenschaft aller lebenden Protoplasmen ist" (Ber. d. Chem. Ges. **25**^{3}, 685, 1892).

Die Beziehung der Milchsäurebildung zum Wachstum ist von *Warburg* gefunden worden. Er stellte fest, daß stark wachsende Zellen, wie die des Embryo und des Tumors, dann auch regenerierende Zellen, wie die des Knochenmarkes an ausgewachsenen Tieren, eine unvergleichlich viel stärkere Glykolyse haben, als Gewebe in Wachstumsruhe. Je jünger ein Gewebe ist, desto größer ist bei ihm der Umfang der Glykolyse. *Warburg* sagt daher, daß „der Satz: Kein Wachstum ohne Glykolyse — für den Organismus der höheren Tiere ohne Einschränkung wahr ist".

Eine Bestätigung dieser Ansicht ist die Arbeit von *Hentschel:* Klin. Woschr. **7**, I 1928, 1086: Über allgemeine Wachstumshemmung durch experimentelle Beeinflussung des Kohlehydratabbaues. *Hentschel* hat unter der Voraussetzung, daß die wachsende Zelle im Organismus

optimal, aber nicht maximal mit Sauerstoff versorgt wird, damit eine physiologische, eine Wachstumsglykolyse stattfinden kann, durch erhöhte Sauerstoffversorgung von Rattensäuglingen die Atmung gesteigert, um eine Einschränkung der Milchsäurebildung zu bekommen. Tatsächlich fand er den Gesamtmilchsäuregehalt der so behandelten Tiere über die Hälfte vermindert gegenüber den Geschwistern, die in Luft aufgezogen worden waren und in Bezug auf das Wachstum waren die Lufttiere den Sauerstofftieren weit überlegen.

Daß die Glykolyse die einzige energieliefernde Reaktion ist, kommt bei gewissen niederen Organismen vor. Die Entdeckung dieser möglichen „Vie sans air" stammt von *Pasteur* (C. r. Acad. scienc. Paris Ts. 52, 56, 75, 80). *Pasteur* beobachtete auch als erster den Zusammenhang zwischen Glykolyse und Atmung: Bringt man Zellen, die anaerob Zucker spalten, in Sauerstoff, so bewirkt die nun einsetzende Atmung, daß der Spaltungsstoffwechsel kleiner wird, bzw. verschwindet. Die Atmung hemmt die Milchsäurebildung. Die Tatsache dieser Verknüpfung nennt man die Pasteursche Reaktion, die von *Oppenheimer* als durchgehendes biologisches Gesetz bezeichnet wird. Daß normale Gewebe unter normalen Lebensbedingungen keine Milchsäure an das Blut abgeben, vertrat schon *Liebig*. Er schrieb 1847: „Zucker und Amylum verwandeln sich im Blute in milchsaure Salze, die ebenso schnell wieder zerstört werden, wie sie sich bilden, und die sich nur da anhäufen, wo die Menge des Sauerstoffes kleiner wird."

Am isolierten Muskel des Kaltblüters beobachteten *Fletcher* und *Hopkins*, daß durch hinzutretenden Sauerstoff die Milchsäure, die durch vorangehende Reizung enstanden war, eine Abnahme erfährt. Diese Autoren haben sich auch schon darüber geäußert, in welcher Weise der Sauerstoff auf die Milchsäure wirkt. Sie waren der Meinung, daß die Abnahme der Milchsäure nicht auf einer einfachen Oxydation beruhe, sondern daß eine Vorstufe der Milchsäure entstehe. Diese Vorstufe ist dach *Meyerhof* Kohlehydrat (Die chemischen Vorgänge im Muskel, 1930: S. 27, 38, 44 ff.). In Versuchen am isolierten intakten Kaltblütermuskel zeigte er, daß Kohlehydrate bei Gegenwart von Sauerstoff gebildet werden, wenn man den Muskel in laktathaltiger Ringerlösung suspendiert. Daß das Verschwinden der Milchsäure bei

Zutritt von Sauerstoff nicht auf einer einfachen Oxydation beruht, ergibt sich auch aus den Zahlenverhältnissen dabei. *Meyerhof* fand, daß die Atmung in der aeroben Phase nur so groß ist, daß sie ein Viertel der enststandenen Milchsäure oxydieren kann, sofern man eine vollständige Oxydation zu Wasser und Kohlendioxyd annimmt. Die Atmung in der Erholungsphase des Muskels bringt mit anderen Worten fünfmal mehr Spaltungsprodukte zum Verschwinden, als sie oxydieren kann. *Meyerhof* hat den Quotienten der Milchsäureoxydation gleich $\frac{\text{geschwundene Milchsäure}}{\text{oxyd. Milchsäureäquivalente}}$ gebildet und mit 4 bis 5 angegeben. *Warburg* hat bei seinen späteren manometrischen Untersuchungen über Atmung und Glykolyse den verbrauchten Sauerstoff nicht auf Milchsäureäquivalente umgerechnet, sondern direkt den Quotienten $\frac{\text{zum Verschwinden gebrachte Milchsäure}}{\text{Mol veratmeter Sauerstoff}}$ gebildet und „Meyerhof-Quotient“ genannt. Er beträgt 1 bis 2, ein Drittel des Wertes, den *Meyerhof* angibt, da 1 Mol Sauerstoff $^1/_3$ Mol oxydierter Milchsäure äquivalent ist. Dieser Quotient ist nach *Warburg* eine eperimentelle Größe, unabhängig von der Theorie, in welcher Weise Atmung und Glykolyse zusammenhängen. Daß der Quotient nicht für alle Gewebe anwendbar ist und vor allem keine Erklärung gibt, wie Atmung und Glykolyse miteinander verknüpft sind, wird im folgenden besprochen werden.

Meyerhof erklärt den Zusammenhang zwischen Atmung und Glykolyse mit einer gekoppelten Reaktion: Ergebnisse der Physiol. **22**, 334, 1923, „Es wird $^1/_5$ der bei der Erholung verschwindenden Milchsäure vollständig oxydiert, gleichzeitig werden $^4/_5$ in Kohlehydrat verwandelt. Das Wesen des Vorganges besteht in einer gekoppelten Reaktion, wobei die Energie zur Synthese von Glykogen aus Milchsäure geliefert wird durch die bei der Oxydation eines Teiles der Milchsäure frei werdende Energie. Vielleicht findet statt Oxydation der Milchsäure auch Verbrennung einer äquivalenten Menge Kohlehydrat statt.“ Die chemischen Vorgänge im Muskel, 1930: „Oxydation und Resynthese sind nicht ein chemisch gekoppelter Vorgang, für den eine stöchiometrische Gleichung anzugeben ist,

sondern ein energetisch gekoppelter", und „die Bedeutung der gekoppelten Reaktion, die in der Erholungsphase des Muskels abläuft, ist darin zu suchen, daß vermittels der Oxydationsenergie die Milchsäure endotherm in Glykogen resynthetisiert".

Nach *Hahn:* Zur Thermodynamik des Erholungsvorganges im Muskel (Z. f. Biol. **91**, 1931, 444) ist diese Erklärung nicht möglich. In dieser Veröffentlichung wird darauf eingegangen, was unter einer gekoppelten Reaktion zu verstehen ist. Es kann in einem System unter besonderen Bedingungen Teilreaktionen geben, bei deren Ablauf die freie Energie zunimmt. Dieser Vorgang ist kein Widerspruch gegen den zweiten Hauptsatz der Wärmelehre, sofern im ganzen System die freie Energie abnimmt. Unter ganzem System wird die Zusammenfassung aller Körper verstanden, die überhaupt eine Veränderung erleiden. „In manchen Fällen kann man zu einer Reaktion, die unter Vermehrung der freien Energie abläuft, einen bestimmten anderen Prozeß angeben, der gleichzeitig unter Abnahme der freien Energie vor sich geht und zwar derart, daß bei dieser Parallelreaktion die freie Energie stärker abnimmt, als sie bei der Hauptreaktion zunimmt. Dann ist auch hier die Forderung des zweiten Hauptsatzes erfüllt. Zwei derartige Reaktionen bezeichnet man als gekoppelt." *Hahn* zitiert dann nach *Ostwald* die Bedingungen, die erfüllt sein müssen, damit man zwei Reaktionen als gekoppelt bezeichnen kann, und stellt fest, daß die Formulierung *Meyerhofs* für den Erholungsvorgang des Muskels diesen Bedingungen nicht entspricht. Die Bezeichnung „gekoppelte Reaktion" ist demnach nicht zutreffend.

Der Begriff der energetischen Koppelung, den *Meyerhof* 1930 einführt, ist nach *Hahn* ebensowenig verwendbar, da es diesen Begriff in der Thermodynamik nicht gibt. „Neben den häufigeren exothermen Reaktionen, d. h. solchen, bei denen freie und Gesamtenergie abnimmt, laufen auch endotherme ab, bei denen die freie Energie ab-, die Gesamtenergie zunimmt. Bei solchen endothermen Reaktionen kann man nicht eine bestimmte exotherme Reaktion angeben, die die notwendige Energie für den endothermen Vorgang liefert, von einer energetischen Koppelung kann man nicht sprechen." Beim Erholungsvorgang des Muskels kann man auch zu dem endo-

thermen Vorgang der Glykogenbildung aus Milchsäure nicht eine bestimmte exotherme Parallelreaktion, die Oxydation eines Teiles der Milchsäure angeben; man kann nur sagen, daß gleichzeitig mit der Glykogenbildung irgendein anderer Prozeß verläuft, bei dem die freie Energie abnimmt, sodaß insgesamt die freie Energie des ganzen Systemes annimmt. „Die Glykogenbildung vollzieht sich nur bei Sauerstoff, ohne daß wir wissen warum. Eine Erklärung hierfür gibt natürlich auch die Annahme einer energetischen Koppelung nicht, ein Begriff, der in Wahrheit nichts anderes aussagt, als daß die Erholung an die Gegenwart von Sauerstoff geknüpft ist. Daher muß er fallen gelassen werden, einmal deshalb, weil der Begriff Koppelung eindeutig und streng in der Thermodynamik festgelegt ist und zwar in ganz anderer Bedeutung, dann auch deswegen, weil bei seiner Anwendung der Anschein erweckt wird, als sei die Erklärung des Erholungsvorganges gefunden, über dessen Natur wir in Wahrheit nichts wissen."

Daß für den Erholungsvorgang im Sauerstoff die Struktur des Muskels eine Rolle spielt, zeigt die Veröffentlichung von *Hahn, Belmonte, Niemer*, Z. f. Biol. **91**, 1931, 491: Über die Bedeutung der Struktur des Muskels für die Kohlehydratbildung in Sauerstoff.

Hahn und Mitarbeiter hatten vorher (Z. f. Biol. **91**, 1931, 53) gefunden, daß am Muskelbrei der Sauerstoff eine andere Wirkung hat als am intakten Muskel. Bei Muskelbrei kommt es durch Sauerstoff zu einer Hemmung der Milchsäure und Neubildung von Kohlehydrat, zu einer wirklichen Erholung. Es wurde daher die Frage interessant, welche Struktur noch erhalten sein muß am Muskel, damit sich der echte Erholungsvorgang abspielt. Die Versuche wurden an Sartorien von Winterfröschen ausgeführt. Man prüfte die Kohlehydratneubildung in verschiedenem Zustand: in unverletztem, isoliertem, dann nach Querdurchschneidung und nach Längsdurchteilung. Es zeigte sich, daß das einmalige Querzerschneiden des Muskels die Bildung von Kohlehydrat in laktathaltiger isotonischer Ringerlösung auf ein Drittel des Wertes vom intakten Muskel herabsetzt. Durch die Längszerschneidung dagegen wurde die Kohlehydratbildung nicht vermindert. *Hahn* sagt daher: „Man kann mit großer Wahrschein-

lichkeit die Annahme machen, daß die normale Bildung von Kohlehydrat in laktathaltiger Lösung an die Struktur der Fibrillen geknüpft ist. Die so erwiesene Abhängigkeit des Erholungsvorganges von der Muskelstruktur erklärt übrigens, warum eine Zurückführung der Erholung auf einfache physikalisch-chemische Prinzipien bis jetzt nicht möglich war."

Die oben schon erwähnte Tatsache, daß Sauerstoff am Muskelbrei eine Hemmung der Milchsäurebildung bewirkt, wurde in folgender Versuchsanordnung gefunden: Man führte in drei Ansätzen mit Warmblütermuskelbrei Milchsäurebesimmungen durch; einmal direkt zu Versuchsbeginn, dann nach zweistündiger Digestion des zweiten Ansatzes im Vakuum und drittens nach ebenso langer Digestion in Sauerstoff. Es fand sich in den Vakuumversuchen eine starke Zunahme der Milchsäure, in den Sauerstoffversuchen dagegen blieb der Anfangswert der Milchsäure (= direkt) erhalten. Diese anfängliche Milchsäurekonzentration kann sogar viele Stunden lang konstant bleiben. Nach diesem Ergebnis wurde auch untersucht, ob Sauerstoff jeden beliebigen Milchsäurewert und nicht nur den direkt vorhandenen konstant erhält. Dies ist tatsächlich der Fall. Zugleich mit den Milchsäurebestimmungen wurden auch Bestimmungen der Gesamtkohlehydrate durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Gesamtkohlehydrate in den Sauerstoffansätzen auch konstant bleiben, oder ganz minimal abnehmen, jedenfalls wurde niemals eine Kohlehydratneubildung aus Milchsäure beobachtet, wie sie beim intakten Muskel vor sich geht. Trotzdem erklärt *Meyerhof* ein Konstantbleiben des Milchsäurewertes im Sauerstoff bei zerkleinerter Muskulatur mit demselben Mechanismus wie beim Erholungsvorgang am intakten Muskel. Auch für den Muskelbrei stellt *Meyerhof* den Oxydationsquotienten der Milchsäure auf, wobei er den Zähler „total geschwundene Milchsäure" durch die Differenz der Milchsäuremengen im Vakuum- und Sauerstoffversuch ersetzt, „mit anderen Worten, das Nichtentstehen einer bestimmten Menge Milchsäure im Sauerstoffverbrauch mit Muskelbrei setzt er gleich dem Verschwinden einer gleich großen Menge bei der Erholung des intakten Muskels" (Z. f. Biol. **91**, 1931, 444; *Hahn*, Thermodynamik). Q ist nach *Meyerhof* auch wie beim intakten Muskel 4

bis 5, daher schließt er auf die Gleichheit der Vorgänge an zerkleinerter und intakter Muskulatur. *Hahn* findet aber in seinen Versuchen, daß der Wert von Q zwischen 3 und 12 schwankt und lehnt deswegen die Aufstellung des Quotienten und damit die Gleichsetzung des Erholungsvorganges mit der Sauerstoffwirkung am Muskelbrei ab. Auch die Tatsache, daß beim Muskelbrei niemals eine meßbare oxydative Resynthese von Kohlehydrat vorkommt, zeigt die Unmöglichkeit, beide Vorgänge in gleicher Weise zu erklären. Für das Konstanterhalten der Milchsäurekonzentration in Sauerstoff kann man nur eine Hemmung der Milchsäurebildung als Ursache annehmen. Eine Erklärung dieser Hemmung durch Sauerstoff am Muskelbrei kann heute noch nicht gegeben werden.

Doch haben *Hahn* und Mitarbeiter weitere Untersuchungen am Muskelbrei angestellt. Auch wenn man die Gleichsetzung der Sauerstoffwirkung an intakter und zerkleinerter Muskulatur ablehnt, ist es von Bedeutung, die Sauerstoffwirkung am Muskelbrei genauer kennen zu lernen, da man nicht annehmen kann, daß die Muskulatur erst durch Zerkleinern die Fähigkeit der Sauerstoffausnutzung bekommt. Diese Wirkung ist sicher auch am intakten Muskel vorhanden und vielleicht wesentlich für die Erklärung des Erholungsvorganges. Die Arbeiten aus dem *Hahn*schen Laboratorium sind in der Ztschr. f. Biol. veröffentlicht: **97**, 1936, 195; **97**, 1936, 578; **98**, 1938, 527. Es zeigte sich, daß der Muskelbrei nach Auswaschen mit Phosphatpuffer ($P_H = 7$ m/25) und Abtrennen von dieser Waschflüssigkeit nicht mehr die Fähigkeit hat, in Sauerstoff die Milchsäurebildung zu hemmen. Aber auch bei der Waschflüssigkeit findet man den Milchsäurewert nach Digestion in Sauerstoff ebenso groß wie im Vakuum und nur wenn man ausgewaschenen Muskelrückstand und Waschflüssigkeit wieder zusammen fügt, kann man die Hemmung der Milchsäurebildung im Sauerstoffansatz wieder beobachten. Diese Befunde sind nur so zu deuten, daß im Muskel ein Stoff vorhanden ist, der zur Hemmung der Milchsäurebildung in Sauerstoff notwendig ist. Dieser Stoff kann mit Phosphatpuffer ausgewaschen werden, und kann nur wirken, wenn auch die Muskelzelle vorhanden ist, denn auch die Waschflüssigkeit zeigte im Ansatz ohne Muskelbrei keine Hemmung der Milchsäurebildung in Sauerstoff. Die weiteren Unter-

suchungen hatten die Isolierung dieses Stoffes zum Ziele, der für die Pasteursche Reaktion notwendig ist. Es gelang, das Eiweiß durch Acetonzusatz von der Waschflüssigkeit abzutrennen, ohne daß der fragliche Stoff mit ausgefällt wurde. In der enteiweißten Flüssigkeit kann man durch Zusatz von Bariumacetat einen Niederschlag bekommen, den man absaugen und trocknen kann. Im Filtrat bleibt die Hauptmenge der in der Waschflüssigkeit vorhandenen Milchsäure. Der getrocknete Niederschlag, der sich zu einem Pulver verreiben läßt, und dessen Hauptmasse aus Bariumphosphat besteht, enthält den für die Hemmung der Milchsäurebildung in Sauerstoff notwendigen Stoff. Durch andere Versuche wurde festgestellt, daß dieser Stoff kochbeständig, also kein Ferment ist. Aus der letzten Mitteilung von *Hahn* geht hervor, daß man durch eine einfachere Methode als Auswaschen des Muskels die hemmende Wirkung des Sauerstoffes auf die Milchsäurebildung vernichten kann. Man braucht den zerkleinerten Muskel nur 2 Stunden im Eisschrank und weitere 45 Minuten bei Zimmertemperatur stehen zu lassen, um ihn unwirksam zu machen. Weiterhin wird in der letzten Veröffentlichung mitgeteilt, daß ein unwirksamer Muskel, wenn man ihm den für die Hemmung der Milchsäurebildung im Sauerstoff notwendigen Stoff zusetzt, keine Atmungssteigerung zeigt. Wenn man wie *Meyerhof* den gesamten Sauerstoffverbrauch bei zerkleinerter Muskulatur auf die Hemmung der Milchsäurebildung bezieht, so ist nicht zu verstehen, wieso ein Muskelbrei ohne diese Hemmung und ein System, was durch einen Zusatz die hemmende Wirkung wieder besitzt, die gleiche Atmungsgröße aufweisen. Das Konstantbleiben der Atmungsgröße bestätigt die frühere Anschauung *Hahns,* daß die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff nichts zu tun hat mit einer gleichzeitigen Oxydation von Milchsäure.

Lipmann hat in der Bioch. Z. (**265,** 1933, 133) Arbeiten veröffentlicht, aus denen er schließt, daß die Hemmung der Glykolyse in der sauerstoffgesättigten Zelle durch reversible oxydative Inaktivierung des glykolytischen Fermentes verursacht wird. Wenn aber das glykolytische Ferment in Sauerstoff unwirksam wird, so müßten bei diesen Bedingungen die Milchsäurewerte durch Oxydation der Milchsäure abnehmen.

Man findet dagegen eine strenge Konstanz der Milchsäurewerte im Sauerstoff.

Eine Ausnahme von der allgemeinen Gültigkeit der Pasteurschen Reaktion, der Hemmung der Milchsäurebildung in Sauerstoff, bildet der Tumor, er hat aerobe Glykolyse. Die Stoffwechseluntersuchungen über Tumoren stammen in der Hauptsache von *Warburg* und Mitarbeitern: Stoffwechsel der Tumoren, 1926. Er bediente sich dabei der manometrischen Methoden mit folgender Neuerung: Das entstehende Kohlendioxyd ließ er nicht durch Alkali absorbieren, sondern durch Bicarbonat von Ringerlösung oder Serum auf Grund der Tatsache, daß Kohlendioxyd im Wasser leichter löslich ist als Sauerstoff. Der Ringerlösung setzte *Warburg* Bicarbonat zu, da die Bicarbonatkonzentration des Serums, bei der die Körperzellen leben, 15-mal größer ist als die Bicarbonatkonzentration der Original-Ringerlösung. Es ergibt sich dann folgendes Prinzip: Bei Zellen, die man in zuckerhaltiger Lösung in einem geschlossenen Gasraum suspendiert, wird ebenso viel Sauerstoff verbraucht, wie Kohlendioxyd ausgeschieden (siehe Stoffwechsel der Tumoren, S. 2), der Druck im Gasraum ändert sich nicht. Wenn aber in dem Gefäß Ringerlösung in größerer Menge vorhanden ist als Gas, so wird der Sauerstoff vorwiegend aus dem Gasraum verbraucht, während die entwickelte Kohlensäure, die Atmungskohlensäure, hauptsächlich in der Flüssigkeit gelöst bleibt. Dann ist mit der Atmung eine Änderung des Gasdruckes verbunden, aus der Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxydbildung berechnet werden können. Diese Änderung ist eine Funktion des Zellstoffwechsels. Bei Zellen in zuckerhaltiger Lösung findet man nun mehr Kohlendioxyd als dem Sauerstoffverbrauch entspricht. Es muß also beim Zellstoffwechsel eine Säure gebildet worden sein, die aus dem Bicarbonat der Suspensionsflüssigkeit im Atmungstrog neue Kohlensäure = Extrakohlensäure in Freiheit gesetzt hat. Diese Säure ist Milchsäure. In Stickstoffatmosphäre muß die gesamte entstehende Kohlensäuremenge als Extrakohlensäure, als Maß der glykolytischen Vorgänge betrachtet werden. Es ist nach *Warburg* einfacher, die Glykolyse nicht chemisch, sondern manometrisch zu messen (Stoffwechsel der Tumoren, S. 94). Die Druckmethode hat außerdem den Vorteil, daß man mit weniger mg Gewebe

auskommt. „Doch darf nicht vergessen werden, daß die Druckmethode eine unspezifische Methode ist und daß die Natur derjenigen Stoffe, die den Druck hervorbringen, durch chemische Kontrollmethoden festzustellen ist.“ Dies ist bei den Arbeiten von *Warburg* geschehen. Die Milchsäure wurde nach der Methode von *Fürth-Charnaß* unter Benutzung der *Embden*schen Vorschrift (in Abd., Handbuch d. Bioch. Arbeitsmethoden V, 2, 1256) ausgeführt. Die erhaltenen Werte stimmten mit den nach der Druckmethode gemessenen gut überein (Stoffwechsel der Tumoren, S. 84). Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxydentstehung reduziert auf die Gewichtseinheit Gewebe (Trockensubstanz) und auf die Zeiteinheit ergeben folgende Quotienten, mit denen *Warburg* die Ergebnisse seiner Arbeiten ausdrückt:

$$Q_{O_2} = \frac{\text{ccm verbrauchter Sauerstoff}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunden}} = \text{Atmung}$$

$$Q^{O_2}_{CO_2} = \frac{\text{cmm Extrakohlensäure, gebildet in O}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunden}} = \text{aerobe Glykolyse}$$

$$Q^{N_2}_{CO_2} = \frac{\text{cmm Extrakohlensäure, gebildet in N}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunden}} = \text{anaerobe Glykolyse}$$

Bei den Messungen im Serum ergaben sich erst Schwierigkeiten, da Serum Kohlenoioxyd chemisch bindet. Man kann aber das Kohlendioxydbindungsvermögen des Serums bestimmen und in die Gleichungen für Ringerlösung einsetzen. Die Quotienten für Serummessungen ändern sich dann in:

$Q^{O_2}_M$ für aerobe, $Q^{N_2}_M$ für anaerobe Glykolyse, wobei Q_M der Quotient der Milchsäurebildung ist.

Die Ergebnisse der Arbeiten sind: Anaerob bildet auch der Tumor in zuckerhaltiger Lösung Milchsäure wie jede Zelle. Daß der Zucker auch nicht in kleinen Mengen auf anderem Wege gespalten wird, zeigen die Messungen von *Negelein* (Bioch. Z. **158**, 121, 1925), der erstens die Abnahme des Bicarbonats in der Ringerlösung mit den erscheinenden Gasmengen und zweitens Zuckerverbrauch mit aus-

getriebenem Kohlendioxyd verglich. Die völlige Reinheit der entstehenden Milchsäure ist auch nachgewiesen worden, „sodaß wir heute die glykolytische Wirksamkeit des Carcinoms präparativ zur Darstellung optisch aktiver Milchsäure benutzen, da die Carcinomgärung eine besonders reine Milchsäuregärung ist“ *(Warburg)*. Die Unterschiede der Tumorgärung gegenüber der der normalen Zelle liegt im Umfange dieses Vorganges. Das Flexner-Jobling Rattencarcinom verbraucht pro Stunde anaerob 12,4 % seines Trockengewichtes an Zucker, das Jensen Rattensarkom 16 % in Ringerlösung wie im Serum. $Q\frac{N_2}{CO_2}$ ist im Mittel 31. Bei menschlicheu Carcinomen, die man möglichst epithelreich wählen muß, um sie mit dem Rattenca vergleichen zu können, fanden sich die Werte $Q\frac{N_2}{CO_2} = 21$, korrigiert für 100 % Ca-Zellen 41 im Mittel, d. h. die menschlichen Ca bilden pro Stunde 8,4 bezw. 16 % ihres Gewichtes an Milchsäure. Bei menschlichen Sarkomen wurden ähnliche Ergebnisse gefunden. Demgegenüber zeigen normale Gewebe eine viel geringere Gärung. Der $Q\frac{N_2}{CO_2}$ ist nach *Warburg* 2,1 bis 3,5 bei Bindegewebe und Epithel. Blut bildet pro Stunde 0,1 % seines Trockengewichtes an Milchsäure. Die glykolytische Wirksamkeit des Ca-Gewebes ist demnach 124mal größer (verglichen mit dem Wert 12,4 des Rattenca) als die glykolytische Wirksamkeit des Blutes. Der Froschmuskel bildet maximal arbeitend 1,5 %, ruhend 0,06 % seines Gewichtes an Milchsäure. Ca-Gewebe bildet also 200 mal soviel Milchsäure wie ein arbeitender Froschmuskel an der Grenze seiner Leistungsfähigkeit. Daß Ca-Gewebe diese Fähigkeit der starken anaeroben Milchsäurebildung nicht erst dann erhält, wenn es aus seinen normalen Verhältnissen herausgelöst wird, zeigt die Tatsache, daß in zuckerhaltiger Ringerlösung aufbewahrtes Ca-Gewebe eine ebenso große Impfausbeute hat, wie frisch aus dem Körper entnommenes Gewebe. In der Ringerlösung hatten die untersuchten Ca-Zellen also normale Lebensbedingungen.

Bei gutartigen menschlichen Tumoren (Blasenpapillome und Nasenpolypen wurden untersucht) zeigte sich ebenfalls die große anaerobe Glykolyse wie bei Carcinomen und Sarkomen. Von normalen Geweben weisen embryonale, stark wachsende Zellen einen solchen Umfang der Gärung auf. Beim Hühnerembryo ist $Q_{CO_2}^{N_2}$ im Mittel 23, also etwa ebenso groß wie bei Tumoren. In Bezug auf sein Gewicht bildet er 9% pro Stunde an Milchsäure. Zwischen embryonales Gewebe und andererseits Bindegewebe und Epithelien reiht sich der Größenordnung von $Q_{CO_2}^{N_2}$ nach Gewebe ein, das niemals stationäre Zustände erreicht: Keimepithel, Thymus, Lymphknoten. $Q_{CO_2}^{N_2}$ betrug hierfür bis 7. Wächst lymphadenoides Gewebe über seinen normalen Umfang, so steigt gleichzeitig die glykolytische Wirksamkeit. Für hyperplastische Mandeln von Kindern wurde $Q_{CO_2}^{N_2} = 18$ im Mittel festgestellt, ein Wert, der dem der Tumoren nahe kommt. Zusammenfassend ist zu sagen, daß die große glykolytische Wirksamkeit eine Eigenschaft aller wachsenden Gewebe ist. In diese Feststellung paßten nur zwei Versuchsergebnisse nicht hinein: graue Hirnsubstanz, bei der die anaerobe Glykolyse so groß wie beim Embryo ist, und die Netzhaut, die eine 4mal größere glykolytische Wirksamkeit hat, als der Embryo. *Warburg* äußert sich dazu folgendermaßen: „Hier könnte man die Annahme machen, die Wachstumruhe der Ganglienzellen und der Netzhaut sei in viel höherem Maße eine scheinbare, als die Wachstumruhe von Bindegewebe und Epithel. Wir wollen eine solche Annahme ad hoc nicht machen, vielmehr schließen, daß der Organismus die anaerobe Spaltungsreaktion, über die er verfügt, verschiedenen Zwecken dienstbar macht."

Welchen Einfluß hat nun Sauerstoff auf diese Stoffwechselgänge?

Weder Gewebe, die dem Keimepithel ähnlich sind, noch Embryonen bilden aerob Milchsäure in nennenswerter Menge. Sauerstoff bringt die Milchsäure praktisch zum Verschwinden. Beim Tumor dagegen

sinkt zwar die Glykolyse unter Einfluß der Atmung, bleibt aber noch bestehen. In Sauerstoff hat der Tumor pro Stunde einen Zuckerverbrauch von 10% seines Eigengewichtes, $Q\frac{O_2}{CO_2}$ ist 25 im Mittel beim Flexner-Jobling-Rattenca, 19.4 bei Rous-Hühnersa, 14 bei menschlichem Ca, 15.6 bei menschlichem Sa. Auch bei gutartigen Tumoren bleibt aerob die Glykolyse bestehen, doch wird sie stärker vermindert, als beim Ca und Sa. Der Mittelwert des $Q\frac{O_2}{CO_2}$ für einen Nasenpolypen betrug 4.6.

Auch in vivo ist die aerobe Glykolyse der Tumoren nachgewiesen: *C.* und *F. Cori* (Journ of Biol. chem. **65**, 397, 1925) haben Glukose- und Milchsäurebestimmungen in den Axillarvenen von Hühnern durchgeführt, deren einer Flügel ein Rous-Sa trug und fanden auf der Tumorseite weniger Glukose und mehr Milchsäure als auf der Normalseite. Bei Menschen wurde der entsprechende Versuch mit einem Unterarmsa gemacht und ein ähnliches Resultat gefunden. *Warburg* untersuchte vergleichend Venen und Arterien und fand bei normalen Organen niemals mehr Milchsäure in den Venen als in den Arterien. Bei Tumoren dagegen waren in jedem geprüften Falle die Milchsäurewerte der Venen höher als die der Arterien. Es besteht also kein Unterschied zwischen den transplantierten Rattentumoren, den menschlichen Spontantumoren und den durch Filtrate erzeugten Rous-Sarkomen: „Die aerobe Milchsäurebildung ist unabhängig von Tier, Ursprungsgewebe und Entstehungsart". Der Stoffwechsel der Tumoren, der also die Pasteursche Reaktion vermissen läßt, ist vorwiegend ein Spaltungsstoffwechsel. Von 13 angegriffenen Zuckermolekülen wird 1 oxydiert, der Rest gespalten. Die Energie, die bei der Glykolyse frei wird, beträgt 42 % der durch die Atmung frei werdenden. Daß die Tumorzelle die Spaltungsenergie wirklich ausnützt, darauf weist die Tatsache hin, daß Insulin das Tumorwachstum hemmt (*Silberstein*, Klin. Woschr. 1925, 356) und wird von *Warburg* auf folgende Weise gezeigt: bringt man Tumorzellen in zuckerhaltige Ringerlösung in Stickstoffatmosphäre, so sind Schnitte des Flexner-Ca noch nach

24-stündigem Sauerstoffmangel, Schnitte des Jensen-Sa nach 72-stündigem transplantabel mit derselben Impfausbeute wie frisches Tumormaterial. Tumorzellen können also eine Zeitlang ausschließlich auf Kosten der Gärung leben. Umgekehrt genügt auch Atmung ohne Gärung, um das Leben der Tumorzellen zu erhalten. *Warburg* und Mitarbeiter beschäftigten sich auch mit der Frage, ob Tumorzellen im lebenden Tier durch Energiemangel abgetötet werden können. Nach dem oben Berichteten wäre dazu nötig, sowohl Gärung wie Atmung zu verhindern. Nach Versuchen in vitro zeigt es sich, daß nach 4-stündiger Unterbrechung der Atmung und Gärung die Hauptmenge der Tumorzellen abgetötet war. Am lebenden Tier jedoch würde schon eine der beiden Maßnahmen, die zur Abtötung der Tumorzelle nötig ist, die Entziehung des Sauerstoffs, die normale Zelle vernichten.

Durch die aerobe Glykolyse unterscheidet sich der Tumor von seinem Ursprungsgewebe, wie auch vom normalen Wachstum. Daß wachsende, teilungsfähige Zellen aus zwei energieliefernden Reaktionen, Gärung und Atmung, leben, gibt es nur bei Tumoren. Trotzdem ist nach *Warburg* die aerobe Glykolyse nicht spezifisch für Tumoren, sondern läßt sich herleiten aus den Stoffwechselkomponenten des Normalen. Der Stoffwechsel der Carcinomzelle ist der Erstickungsstoffwechsel normal wachsender Körperzellen. Experimentell kann man durch Störung der Atmung in verschiedenen Zellen aerobe Glykolyse erzeugen. Während aber normale Zellen, wenn sie aerob glykolysieren, zugrunde gehen, wächst die Tumorzelle unbegrenzt unter Ausnutzung der Glykolyse. Eine Störung der Atmung ist die Ursache der aeroben Glykolyse. In den meisten Fällen ist die Atmung der Tumorzellen zu klein. *Warburg* hat aber auch Tierca gefunden, bei denen die Atmung groß war und trotzdem nicht imstande, die Gärung zu hemmen. Nach dieser Entdeckung kat *Warburg* die Klassifizierung der Gewebe nach dem Gärungsrest U $\left(= Q_M^{N_2} - 2\,Q_{O_2}\right)$ aufgegeben. Die Störung der Atmung bei Tumoren sieht er durch eine Hemmung der Größe oder Hemmung der Wirkung der Atmung veranlaßt.

Die Tatsache, daß es auch Tumoren mit einer der großen Gärung entsprechend großen Atmung gibt, die trotzdem aerob glykolysieren, spricht auch dafür, daß die Pasteursche Reaktion mit dem Meyerhof-Quotienten zu erklären ist, sondern der Sauerstoff in anderer Weise auf die Gärung wirkt. Auch die Ergebnisse von *Klempner,* über die *Schlayer* in der Bioch. Z. **293,** 1937, 94 berichtet, zeigen, daß die hemmende Wirkung des Sauerstoffes auf die Gärung nicht durch eine gleichzeitige Oxydation von Milchsäure zu erklären ist. *Klempner* fand im Gegensatz zu *Warburg* eine Abhängigkeit der Atmung vom Sauerstoffdruck. Bei 33% Sauerstoff war die Atmung um 60% gehemmt und trotzdem war die Hemmung der Milchsäurebildung total.

Wenn für die aerobe Glykolyse der Tumoren eine unzulängliche Wirkung des Sauerstoffes und nicht eine Störung der Atmungsgröße verantwortlich zu machen ist, so kann man vielleicht annehmen, daß der Stoff, der von *Hahn* und Mitarbeitern aus Muskeln als Bariumpräparat gewonnen wurde und der am Muskelbrei die Hemmung der Milchsäurebildung in Sauerstoff herbeiführt, im Tumorgewebe fehlt. Versuche darüber, ob das Präparat auch bei Tumorzellen wirksam ist, sind von *Hahn* und Mitarbeitern in Angriff genommen worden.

Herrn Professor *Hahn* möchte ich für die Überlassung der Arbeit und für die Übernahme des Referates meinen Dank aussprechen.

Im Text nicht angegebene Literatur

Hahn, A.: Z. f. Biol. **92**, 1932, 317. — Lehrbuch der Biochemie, 1932.

Oppenheimer: Handbuch der Biochemie. Bd 2: Biochemie der Zelle.

Warburg, O.: Bioch. Z. **184**, 1927, 484; **204**, 1929, 482; **214**, 1929, 5. Klin. Wosch. 2, I, 776, 1923; 4, II, 1925. 40. Kong. f. inn. Med. 1928, S. 11

Wind: Bioch. Z. **179**, 1926, 384.

Lebenslauf

Ich wurde geboren am 22. März 1913 in Herleshausen als Tochter des Reichsbahnbeamten Gustav Fischbach und seiner Ehefrau Ella, geb. Richert. Nach achtjährigem Besuch der Viktoriaschule zu Frankfurt a. M. bestand ich im Februar 1932 die Reifeprüfung. Mein medizinisches Studium begann ich in Innsbruck und legte das Physikum 1934 in München ab. Nach weiteren Studien an den Universitäten in München und Innsbruck bestand ich das medizinische Staatsexamen im Dezember 1937 in München. Seit dieser Zeit bin ich in München als Medizinalpraktikantin tätig.